



Протокол получения трансформантов вигны *Vigna unguiculata* (L.) Walp. – носителей редактирующих конструкций

Е. А. Крылова¹, О. С. Ефремова^{1,2}, П. С. Вилис¹, Е. К. Хлесткина¹, Ю. В. Ухатова^{1,2}

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

²Научно-технологический университет «Сириус», Центр генетики и наук о жизни, Краснодарский край, Россия

Автор, ответственный за переписку: Екатерина Александровна Крылова, e.krylova@vir.nw.ru

Актуальность. Для трансформации клеток высших растений чаще всего используют метод агробактериальной трансформации, при этом важное значение имеет выбор экспланта, состав питательных сред для отбора и регенерации трансформантов. Вигна *Vigna unguiculata* (L.) Walp., представитель семейства Бобовых, относится к культурам, сложно поддающимся трансформации в связи с низким регенерационным потенциалом после инокуляции агробактерий. Поиск генотипов, отличающихся высокой степенью регенерации, а также составление эффективного протокола агробактериальной трансформации являются актуальной задачей для доставки компонентов системы редактирования. Цель настоящего исследования – разработать эффективный протокол получения трансформантов вигны – носителей редактирующих конструкций. **Материалы и методы.** Разработку эффективного протокола получения трансформантов вигны для доставки компонентов системы редактирования осуществляли при использовании образцов коллекции ВИР. В качестве эксплантов использовали части семядольного узла. Для увеличения площади раневой поверхности эксплант формировали путем продольного разреза семядольного узла. Агробактериальную трансформацию проводили при использовании генетической конструкции, созданной на основе вектора pKSE401 с компонентами системы редактирования CRISPR/Cas9. Индукцию органогенеза осуществляли на питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением 6-бензиламинопурина. В статье описан пошаговый протокол для эффективного получения фертильных трансформантов вигны. **Результаты и обсуждение.** Мы экспериментально подтвердили способность части семядольного узла вигны к органогенезу побегов в культуре *in vitro*, а также возможность использования их в качестве эксплантов для агробактериальной трансформации с достижением частоты фертильных трансформантов на уровне 6,2% для генотипа к-642. Сравнение эффективности трансформации с данными предшествующих работ по агробактериальной трансформации вигны указывает на лучший выход трансформантов на основе предложенного нами протокола. Поскольку протокол валидирован в эксперименте с вектором, несущим компоненты системы редактирования CRISPR/Cas9, его можно рекомендовать для использования в работах по получению отредактированных растений вигны. **Заключение.** Полученные результаты агробактериальной трансформации модифицированного типа эксплантов вигны свидетельствуют о возможности успешного использования представленного протокола для генетической трансформации данной культуры. Генотип к-642, показавший эффективность не только на этапах регенерации и трансформации, но также на стадиях укоренения и последующей адаптации растений к нестерильным условиям, может быть рекомендован для дальнейших фундаментальных исследований вигны при помощи методов обратной генетики.

Ключевые слова: вигна, агробактериальная трансформация, регенерация *in vitro*, регенеранты, редактирование

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках государственного задания согласно тематическим планам ВИР по проекту №FGEM-2022-0002 «Выявление возможностей генофонда бобовых культур для оптимизации их селекции и диверсификации использования в различных отраслях народного хозяйства».

Для цитирования: Крылова Е.А., Ефремова О.С., Вилис П.С., Хлесткина Е.К., Ухатова Ю.В. Протокол получения трансформантов вигны (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) – носителей редактирующих конструкций. *Биотехнология и селекция растений*. 2025;8(2):7-15. DOI: 10.30901/2658-6266-2025-2-04

Прозрачность финансовой деятельности: Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы.

© Крылова Е.А., Ефремова О.С., Вилис П.С., Хлесткина Е.К., Ухатова Ю.В., 2025

Original article

DOI: 10.30901/2658-6266-2025-2-o4

Protocol for obtaining *Vigna unguiculata* (L.) Walp. transformants carrying editing constructs

Ekaterina A. Krylova¹, Olga S. Efremova^{1,2}, Polina S. Vilis¹, Elena K. Khlestkina¹, Yulia V. Ukhatova^{1,2}¹N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia²Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, Krasnodar Region, Russia**Corresponding author:** Ekaterina A. Krylova, e.krylova@vir.nw.ru

Background. The method of agrobacterium mediated transformation is most often used for the transformation of higher plant cells. The choice of explant type, the composition of nutrient media for the selection and regeneration of transformants are important. Cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. is a legume crop. It is recalcitrant for transformation due to its low regeneration after agrobacterial inoculation. The search for genotypes with a high regeneration ability, as well as the creation of an effective protocol for optimal *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection protocol are urgent tasks for the delivery of editing system components. The aim of this study is to develop an effective protocol for obtaining cowpea transformants carrying editing constructs. **Material and methods.** The development of the efficient protocol for obtaining cowpea transformants for the delivery of editing system components was carried out using accessions from the VIR collection. Cotyledonary node parts were used as explants formed by longitudinal incision of the cotyledon node in order to increase the wound surface area. The agrobacterium mediated transformation was performed using a vector on the base of pKSE401 with components of the CRISPR/Cas9 editing system. Organogenesis was induced on MS nutrient medium with phytohormones. The article describes a step-by-step protocol for the efficient production of fertile cowpea transformants. **Results and discussion.** We experimentally confirmed the organogenetic capacity of the cowpea cotyledonary node parts to produce shoots *in vitro*, as well as the possibility of using them as explants for agrobacterium mediated transformation. The frequency of fertile transformants was 6.2% for k-642 genotype. A comparison of the transformation efficiency with the data from previous studies on the cowpea agrobacterium mediated transformation indicates a better yield of transformants based on our proposed protocol. Since the protocol has been validated in the experiment with a vector carrying components of the CRISPR/Cas9 editing system, it can be recommended for use in studies on the production of edited cowpea plants. **Conclusion.** The obtained results of the agrobacterium mediated transformation of cowpea modified type explants indicate the possibility of successful use of the presented protocol for the genetic transformation of this crop. The k-642 genotype was efficient not only at the stages of regeneration and transformation, but also at the stages of rooting and subsequent plant adaptation to non-sterile conditions. This genotype can be recommended for further fundamental cowpea studies using reverse genetics methods.

Keywords: cowpea, agrobacterium mediated transformation, *in vitro* regeneration, regenerants, editing

Acknowledgements: The work was financially supported within the framework of the State Assignment in accordance with the thematic plans of VIR project No. FGEM-2022-0002 “Identifying possibilities in the genetic diversity of leguminous crops to optimize their breeding and diversify uses in various sectors of the national economy”.

For citation: Krylova E.A., Efremova O.S., Vilis P.S., Khlestkina E.K., Ukhatova Yu.V. Protocol for obtaining *Vigna unguiculata* (L.) Walp. transformants carrying editing constructs. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2025;8(2):7-15. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2025-2-o4

Financial transparency: The authors have no financial interest in the presented materials or methods. The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employers.

© Krylova E.A., Efremova O.S., Vilis P.S., Khlestkina E.K., Ukhatova Yu.V., 2025

Введение

В настоящее время методы геномного редактирования активно используются для получения растений с новыми заданными свойствами. Это приобретает особую актуальность при ответе на постоянно возникающие перед современным обществом новые вызовы. Система CRISPR/Cas9 является одной из наиболее разработанных и используется для внесения различных модификаций в геном растительных клеток, в том числе с целью улучшения свойств сельскохозяйственных растений (Ukhatova et al., 2023). Наиболее частым методом доставки компонентов системы редактирования остается агробактериальная трансформация, эффективность которой зависит от многих факторов, в числе которых видо- и генотип-специфические особенности, тип экспланта, условия и метод культивирования, состав питательных и инокуляционных сред, индукторы генов вирулентности, штамм агробактерии. Обязательным условием является высокая степень регенерационной способности для последующего получения полноценных растений. В первую очередь это связано с генотипом. Индукция морфогенеза регулируется на различных уровнях, а характер, соматический эмбриогенез или органогенез, зависит от типа экспланта, его возраста, генотипа, состава питательных сред (Mao et al., 2006).

Представители семейства Бобовых являются крайне сложными объектами для работ в культуре *in vitro*, отличаясь низкой способностью к корнеобразованию, достаточно сложно поддаются трансформации из-за сниженной регенерационной способности после инокуляции агробактериями (Somers et al., 2003; Efremova et al., 2017; Pratar et al., 2018). Частота получения трансформантов вигны варьирует в пределах 0,15-3,9% (Bett et al., 2019). Между тем вигна *Vigna unguiculata* (L.) Walp. относится к высокорентабельным зернобобовым культурам и имеет высокий потенциал для экспорта в Китай, Южную Корею и страны Юго-Восточной Азии. Генетическое редактирование вигны с целью улучшения хозяйственно-ценных признаков является актуальной задачей в свете перспективы селекции следующего поколения (next-generation breeding). Кроме того, нокаут генов при помощи системы редактирования является эффективным подходом обратной генетики (Ji et al., 2019; Ukhatova et al., 2023; Gerasimova et al., 2023) и служит для установления функциональной роли генов. Для вигны, как мало изученного объекта с точки зрения молекулярной генетики, эти подходы являются актуальными.

К настоящему времени число публикаций по генетическому редактированию вигны невелико (Ji et al., 2019; Juranić et al., 2020; Che et al., 2021). В одной из работ изучена функция гена – потенциального регулятора клубенькообразования в культуре бородатых (волосовидных) корней (Ji et al., 2019), в другой – применялись методы транзientной экспрессии с последующим анализом изменений на клеточном уровне (Juranić et al., 2020). Толь-

ко в третьей работе были получены растения T1; в качестве эксплантов для агробактериальной трансформации использовали эмбриональные оси. Однако примененный авторами исследования способ экспресс-оценки (Che et al., 2021) не позволяет сопоставить эффективность трансформации, которую удалось достичь в данной работе, с результатами предшествующих публикаций (Sahoo et al., 2003; Somers et al., 2003; Popelka et al., 2006; Pal et al., 2011; Behura et al., 2014; Bett et al., 2019).

Цель настоящего исследования – разработать эффективный протокол получения трансформантов вигны *V. unguiculata* – носителей редактирующих конструкций.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили два образца вигны – к-640 и к-642 – из коллекции ВИР. Для работы были взяты семена репродукции 2022 года. Данные образцы вигны неоднократно изучали на опытных станциях ВИР (Burlayaeva et al., 2014), они охарактеризованы по содержанию биологически активных веществ в семенах с применением методов масс-спектрометрии, а также было детектировано распределение этих веществ с использованием лазерной микроскопии (Razgonova et al., 2022). Кроме этого, генотип к-642 был выбран как модель для проведения сравнительного транскриптомного анализа образцов в контрастных по влажности воздуха условиях (Krylova et al., 2024).

Для оценки эффективности различных стерилизующих агентов использовали 20% раствор бытового хлорсодержащего отбеливателя ACE (Procter & Gamble, Россия), 17% раствор перекиси водорода, а также 3% раствор универсального дезинфицирующего средства Велтолен-Экстра (ООО «НПО Велт», Россия). В качестве действующего вещества средство Велтолен-Экстра содержит 20% клатрат четвертичного аммониевого соединения с карбамидом.

Питательные среды:

1. Твердая безгормональная среда Мурасиге-Скуга (МС), содержащая макроэлементы, микроэлементы, витамины (Murashige, Skoog, 1962), сахарозу 30 г/л, агар 6,3 г/л, pH 5,8. После приготовления среду автоклавируют.
2. Жидкая питательная среда YEP: 5 г/л NaCl, 10 г/л бакто-триптона, 10 г/л бакто-дрожжевого экстракта. Среда необходимо автоклавируется.
3. Твердая питательная среда YEP: жидкая среда YEP с добавлением агара 15 г/л. Среда стерилизовали автоклавированием.
4. Среда для трансформации: $\frac{1}{2}$ МС без витаминов, сахароза 10 г/л, pH 5,8. После приготовления среду автоклавируют.

Все необходимые растворы антибиотиков: канамицин сульфат (Sigma-Aldrich, USA), рифампицин (Sigma-Aldrich, USA) и цефотаксим (Sigma-Aldrich, USA) – стерилизовали через стерильный мембранный фильтр

(размер пор 0,22 мкм) и добавляли в охлажденную до 50°C среду МС или YEP. Для активации генов вирулентности использовали ацетосирингон (HiMedia, India).

Основной задачей первого этапа является получение достаточного количества проростков для проведения дальнейшего эксперимента. Исходным материалом для введения в асептические условия служили семена вигны *V. unguiculata*. Семена в течение 15 минут тщательно промывали мыльным раствором, затем водопроводной водой. Затем поверхностно стерилизовали в течение одной минуты 96% этанолом. В качестве стерилизующего агента использовали 20% раствор бытового хлор-содержащего отбеливателя АСЕ, в котором выдерживали семена в течение 15 минут. Все дальнейшие работы проводили в ламинар-боксе. Семена трижды промывали в автоклавированной дистиллированной воде. Затем помещали их на питательную среду МС с добавлением 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП). Для последующей совместной культивации с агробактерией из 7-10-дневных проростков формировали экспланты – семядольные узлы, разрезанные вдоль. Затем экспланты культивировали на питательной среде МС, в которую был добавлен 0,5 мг/л 6-БАП, в стерильных чашках Петри диаметром 9 см в темноте при температуре +25°C в течение двух суток (рис. 1а, рис. 1б).

Для агробактериальной трансформации использовали генетическую конструкцию размером 17222 пн, созданную на основе вектора pKSE401 согласно опубликованному протоколу (Xing et al., 2014). Редактирующая конструкция состояла из AtU6-26-промотора, каркаса нРНК (направляющая РНК) и AtU6-26-терминатора. В качестве селективного маркера для отбора трансформантов был использован ген устойчивости к канамицину под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты. В качестве репортерного гена использован ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок GFP. Для генетической трансформации использовали штамм AGL-1 *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn., трансформацию бактерий проводили методом «замораживания-теплового шока» (Jyothishwaran et al., 2007).

Для получения суспензионной культуры агробактерии, несущей рекомбинантную плазмиду, колонию помещали в жидкую питательную среду YEP с добавлением антибиотиков рифампицина и канамицина в концентрациях соответственно 40 мг/л и 50 мг/л. Нарастивание ночной бактериальной культуры проводили в течение 14-16 часов при температуре +28-30°C на орбитальном шейкере-инкубаторе при 200 об/мин.

Трансформация эксплантов заключалась в их совместном культивировании с ночной культурой *A. tumefaciens*, во время которого происходит перенос Т-ДНК Ti-плазмиды агробактерии в геном растения с последующей регенерацией и отбором трансформантов на селективной сре-

де.

В условиях ламинар-бокса подготовленные экспланты помещали в 180 мл питательной среды для трансформации с добавлением 20 мл ночной бактериальной культуры и 16 мкл 100 мМ раствора ацетосирингона. Предварительно полученную агробактериальную культуру разбавляли средой для трансформации без агара до $OD_{600}=0,6-0,8$. Оптическую плотность суспензии определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Затем экспланты инкубировали в бактериальной суспензии в течение двух часов при температуре +30°C на орбитальном шейкере-инкубаторе при 200 об/мин. После инокулирования экспланты переносили на стерильную фильтровальную бумагу для удаления суспензии агробактерии, а затем помещали на питательную среду МС, в которую добавлен 0,5 мг/л 6-БАП. Последующее совместное культивирование агробактерии и эксплантов проводили в течение трёх суток в темноте при температуре 25°C. Контрольные экспланты не инкубировали в агробактериальной суспензии, оставляли в чашках Петри.

Трансформированные экспланты культивировали на питательной среде МС с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП и цефотаксима в концентрации 1000 мг/л для элиминации роста агробактерии в течение 10-14 дней. Контроль пересаживали на свежую среду МС с 0,5 мг/л 6-БАП и оценивали процент регенерации. Культивирование эксплантов осуществляли в световой комнате при температуре +24-25°C; освещенности пять тыс. лк; продолжительности светового дня 16 часов. Со второго пассажа в питательную среду вводили селективный антибиотик канамицин в концентрации 25 мг/л. Время культивирования в таких условиях составляло 10-14 дней (рис. 1с, рис. 1д), после чего регенеранты переносили на свежую среду МС с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП и канамицина в двойной концентрации 50 мг/л. Неустойчивые регенеранты со временем меняли окраску, засыхали и постепенно погибали. Полученные канамицин-устойчивые (Km^R) регенеранты были пересажены на питательную среду для корнеобразования – $1/2$ МС с добавлением 0,25 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (НУК) (рис. 1е, рис. 1ф). Часть регенерантов постепенно темнела и растения погибали.

Укоренившиеся трансформанты переносили в предварительно автоклавированный универсальный питательный торфогрунт, изготовленный из смеси торфяных грунтов различной степени разложения (TerraVita, Россия). Дополнительные обработки в процессе роста растений не применялись. В течение 10 дней в период адаптации растения накрывали прозрачной крышкой, которую в дальнейшем убрали (рис. 2а). Растения выращивали в климатической камере (Weiss Technik, Германия) при продолжительности светового дня 12 ч, температуре воздуха 25°C, влажности воздуха 60% (рис. 2б, 2с).

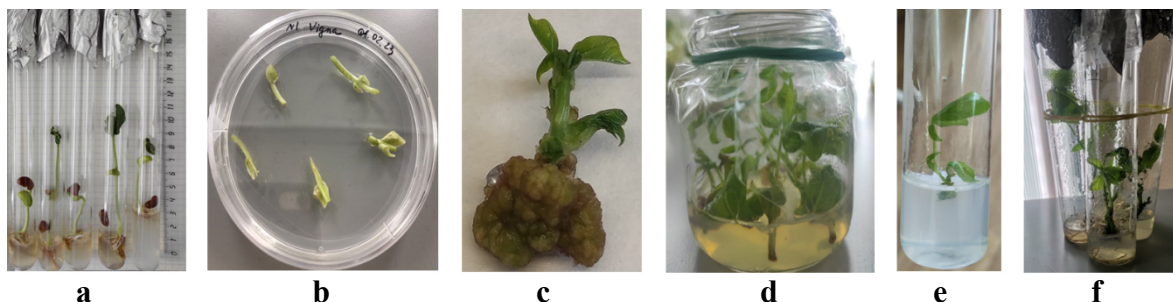


Рис. 1. Стадии эксперимента в условиях *in vitro*

а – введение в асептические условия образца к-642, б – экспланты, семядольные узлы, разрезанные вдоль для трансформации, с – растение-регенерант, d – регенеранты на стадии селективного отбора, е, f – этап укоренения

Fig. 1. Stages of the *in vitro* experiment

a – introduction of k-642 to aseptic conditions, b – explants, cotyledonary nodes longitudinally incised for transformation, c – regenerated plant, d – regenerants at the stage of selective screening, e, f – plants at the rooting stage

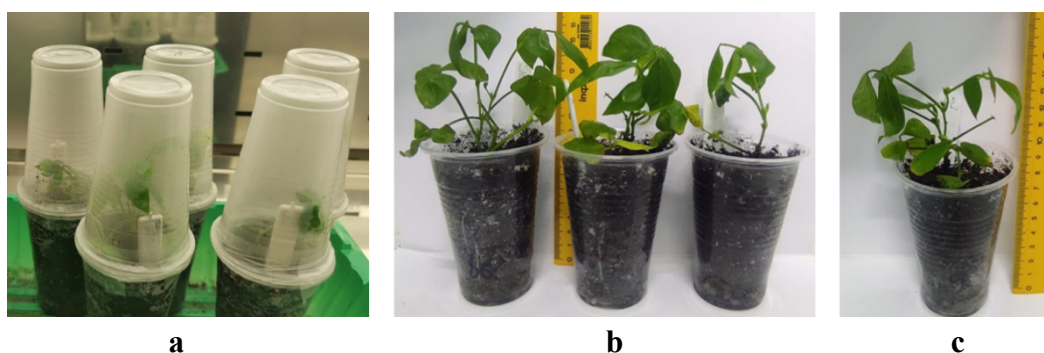


Рис. 2. Адаптация растений-регенерантов вигны к нестерильным условиям

а – первый этап адаптации, б, с – последующие этапы адаптации

Fig. 2. Adaptation of cowpea regenerated plants to non-sterile conditions

a – first stage of adaptation, b, c – subsequent adaptation stages

Для определения статуса трансформантов проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Геномную ДНК выделяли с использованием набора «Сорб-ГМО-Б» (Синтол, Россия). Измерение концентрации выделенной ДНК проводилось с помощью спектрофотометра NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, США). Оценку качества препаратов ДНК проводили с использованием метода электрофореза в 1% агарозном геле. В качестве отрицательного и положительного контролей использовали препараты геномной ДНК, полученные из растений дикого типа, и плазмидную ДНК вектора, соответственно.

Праймеры, разработанные к фрагментам генов *Cas9*, *GFP* и гену, кодирующему канамицин (*Km*), были сконструированы и проанализированы с использованием PrimerQuest™ Tool (Integrated DNA Technologies, 2024). Последовательности использованных в работе праймеров приведены в Таблице 1. Амплификацию геномной ДНК проводили в 20 мкл ПЦР-смеси. Реакционные

смеси содержали 50-100 нг ДНК матрицы, 1× реакционный буфер (67 mM трисHCl, pH 8,8; 2 mM MgCl₂; 18 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20), 1,5 mM MgCl₂, 0,25 mM каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, по 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров, 5 е.а./мкл ДНК полимеразы (Синтол, Россия). После первоначальной денатурации при 94°C в течение 2 мин было проведено 35 циклов при 95°C в течение 30 секунд, 55°C в течение 30 секунд и 72°C в течение 1-2 мин с последующей финальной элонгацией при 72°C в течение 5 мин. Разделение амплифицированных фрагментов ДНК проводили в 1% горизонтальном агарозном геле, приготовленном на основе буфера TAE с добавлением бромистого этидия, размеры ампликонов оценивали с помощью маркера молекулярного веса ДНК Step 100 (Биолабмикс, Россия). Для визуализации полученных продуктов использовали гель-документирующую систему Bio-Rad ChemiDoc MP (Bio-Rad, США).

Таблица 1. Праймеры, использованные в исследовании

Table 1. Primers used in the study

Ген/ Gene	Прямой праймер (5'→3')/ Forward primer (5'→3')	Обратный праймер (5'→3')/ Reverse primer (5'→3')	Ожидаемый размер продукта, пн/ Expected product size, bp
<i>Cas9</i>	CGATCAGTCGAAGAACGGCTAC	CTTCACCTTAGTCAGCTCGTTG	529
<i>GFP</i>	TGACCCTGAAGTTCATCTGC	GATCTTGAAGTTCACCTTGATGC	377
<i>Km</i>	CTCCTGCCGAGAAAGTATCC	GGTAGCCAACGCTATGTCC	353

Результаты и обсуждение

Введение в стерильные условия. Для успешности проведения генетического редактирования первым этапом является подбор питательных сред и стерилизующего агента для инициации культуры в асептических условиях. Кроме этого, необходимо выбрать генотипы с высоким регенерационным потенциалом, определить оптимальный состав питательных сред для стимуляции роста и развития растений. Нами была проведена серия экспериментов по оценке эффективности различных стерилизующих агентов: 20% раствор бытового хлорсодержащего отбеливателя ACE, 17% раствор перекиси водорода, а также 3% раствор универсального дезинфицирующего средства Велтолен-Экстра – при введении в стерильные условия семян образцов вигны из коллекции ВИР. Нами была показана высокая эффективность трех вариантов стерилизации: 1) 98% в случае стерилизации ACE, 2) 95% при использовании перекиси водорода

и 3) 95% средства Велтолен-Экстра. Для дальнейших этапов работы мы использовали представленный в разделе Материалы и методы протокол стерилизации семян вигны с использованием в качестве стерилизующего вещества 20% раствора бытового хлорсодержащего отбеливателя ACE как наиболее простой.

Агробактериальная трансформация. Для получения растений-трансформантов одним из важнейших условий является способность культивируемых эксплантов к органогенезу и формированию полноценных побегов. Известно, что в работах по агробактериальной трансформации таких культур как вигна и соя чаще всего используют семядольный узел в качестве экспланта. Нами была модифицирована методика формирования экспланта – семядольный узел был разрезан вдоль, что способствовало увеличению площади раневой поверхности. Для получения семядольных узлов в культуру *in vitro* было введено 100 семян к-640 и 200 семян к-642. Всего было сформировано 163 экспланта к-640 и 392 к-642 (табл. 2).

Таблица 2. Сводные результаты по трансформации эксплантов вигны к-640 и к-642

Table 2. Total results of explant transformation in k-640 and k-642 cowpea accessions

Номер по каталогу VIP/VIR Catalogue No.	Число семян, шт/ Seeds, pcs	Число контрольных эксплантов, шт/ Control explants, pcs	Частота регенерации (%)/ Regeneration frequency (%)	Число эксплантов для трансформации, шт/ Explants for transformation, pcs	Число Km^R регенерантов, шт/ Km^R explants, pcs	Число растений адаптированных к нестерильным условиям, шт/ Plants adapted to non-sterile conditions, pcs	Число фертильных растений, шт/ Fertile plants, pcs
к-640	100	50	98	113	13 (12%)	0	-
к-642	200	150	95	242	91 (38%)	15	15
Итого	300	200	-	355	104	15	15

Контроль, а именно экспланты, не подвергшиеся совместной инкубации с агробактерией, высаживали на питательную среду. Спустя 10-14 дней оценивали число образовавшихся растений. Полученные результаты свидетельствуют о высокой регенерационной способности включенных в опыт генотипов – более 95%.

Агробактерия и антибиотики оказывают угнетающее действие на регенерацию и рост растений. В эксперименте по агробактериальной трансформации после переноса эксплантов на питательную среду, содержащую селективный антибиотик канамицин, большее число регенеран-

тов – 91 – удалось получить для образца к-642, в то время как значительное число эксплантов образца к-640 погибли в результате некроза. Регенеранты имели разную устойчивость к селективному антибиотику, так, чувствительные к канамицину растения быстро проявляли признаки хлороза, постепенно увядали и отмирали. В процессе селекции регенерантов на питательной среде с антибиотиком всего было отобрано 104 Km^R растения, большинство которых (91 растение) имели генотип к-642.

Укоренение и адаптация к нестерильным условиям. На следующем этапе работы было необходимо пере-

нести канамицин-устойчивые растения на питательную среду для укоренения. Для этого растения переносили на питательную среду $1/2$ МС с добавлением 0,25 мг/л НУК. Необходимо подчеркнуть, что при проведении агробактериальной трансформации регенерационный потенциал культивируемых эксплантов вне зависимости от их типа существенно снижается. Растения, прошедшие этап агробактериальной трансформации, образуют корни намного хуже по сравнению с контрольными растениями. В итоге нам удалось получить 15 растений с хорошо развитой корневой системой, которые в последующем были адаптированы к нестерильным условиям. Со всех растений удалось собрать семена.

Эксперимент по проведению агробактериальной трансформации вигны продолжался 3-4 месяца от этапа введения семян в стерильные условия до момента пере-

вода образовавшихся, укоренившихся растений после селективного отбора на среде с канамицином в нестерильные условия почвогрунта.

Проверка статуса регенерантов. Для определения статуса регенерантов, устойчивых к канамицину, нами был проведен ПЦР-анализ. При амплификации с использованием специфичных праймеров (см. табл. 1) к последовательности селективного гена *Km* был получен фрагмент у большинства регенерантов: 101 растение из 104, прошедших селективный отбор на среде с антибиотиком (рис. 3с). Интеграция репортерного гена *GFP* была установлена у 64 растений-регенерантов, содержащих ген *Km* (рис. 3а). Кроме этого, со всеми препаратами геномной ДНК была выполнена ПЦР с праймерами к гену *Cas9* (рис. 3б).

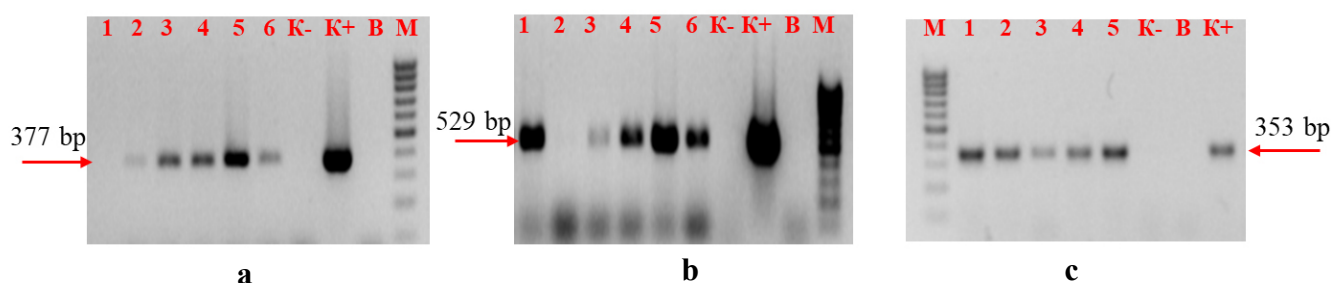


Рис. 3. ПЦР анализ растений регенерантов, устойчивых к канамицину, с помощью праймеров, разработанных к фрагментам генов:

a – *GFP*, b – *Cas9*, c – *Km*. Стрелкой обозначен фрагмент ожидаемого размера. 1-6 – растения-регенеранты, устойчивые к канамицину, В – вода, К– – отрицательный контроль: геномная ДНК, выделенная из образца вигны к-642; К+ – положительный контроль: плазмидная ДНК на основе вектора pKSE401, М – маркер молекулярного веса ДНК Step 100

Fig. 3. PCR analysis of regenerated kanamycin resistant plants using primers to gene fragments:

a – with primers to the *GFP* gene, b – with primers to the *Cas9* gene, c – with primers to the *Km* gene. The arrow points to a fragment of expected size. 1-6 – regenerated kanamycin resistant plants, b – water, K– – negative control: genomic DNA isolated from cowpea accession k-642, K+ – positive control (plasmid DNA pKSE401), M – molecular weight marker DNA Step 100

По результатам ПЦР-анализа ДНК 104 растений, фрагменты ожидаемых размеров с тремя парами праймеров были детектированы у 50 регенерантов, прошедших селективный отбор на канамицине, что составляет 48% от их общего числа.

Несмотря на то, что в настоящее время для вигны разработаны протоколы *Agrobacterium*-опосредованной доставки конструкций с использованием различных типов эксплантов: семядольных узлов, семядолей, эмбриональных осей, частей стебля – частота трансформации не столь велика (Muthukumar et al., 1996; Sahoo et al., 2003; Somers et al., 2003; Popelka et al., 2006; Pal et al., 2011; Behura et al., 2014; Bett et al., 2019). В первых работах по агробактериальной трансформации вигны в качестве эксплантов использовали семядоли и для подтверждения факта трансформации применяли методику Саузерн-гибридизации, при этом авторам исследования удалось подтвердить трансформацию четырех растений, для кото-

рых не было получено семян (Muthukumar et al., 1996). При использовании семядольных узлов в качестве эксплантов, доля трансформантов с подтверждением результатов методом ПЦР, варьирует от 2% (Ignacimuthu, 2000) до 2,59% (Behura et al., 2014). Если в качестве экспланта использовали эмбриональные оси, частота трансформации также была невелика: 1-3 растений из 1000 исходных эксплантов (Popelka et al., 2006). Авторы исследований не всегда указывают частоту трансформации, отмечая только число выживших растений с подтверждением результатов методом ПЦР (Pal et al., 2011). Протоколы по доставке редактирующих конструкций с использованием агробактериальной трансформации единичны (Juranić et al., 2020; Che et al., 2021), однако сопоставить и оценить результаты по эффективности проведенной трансформации не представляется возможным. В настоящем исследовании нами предложен способ модификации формирования первичного экспланта на основе семядольных

узлов и была показана эффективность агробактериальной трансформации этого типа эксплантов вигны при использовании редактирующей конструкции на основе pKSE401. Нам удалось получить 6,2% фертильных трансформантов для образца к-642, кроме этого, по результатам ПЦР со специфическими праймерами к генам в составе редактирующей конструкции показана высокая частота трансформации, а именно 48% от общего числа регенерантов, прошедших селективный отбор на антибиотике. В дальнейшем будет проведен дальнейший поиск образцов вигны, которые, как и к-642, можно рекомендовать для экспериментов с использованием методов генетического редактирования.

Заключение

Полученные результаты агробактериальной трансформации модифицированного типа эксплантов вигны свидетельствуют о возможности успешного использования представленного протокола для генетической трансформации данной культуры. Генотип к-642, показавший эффективность не только на этапах регенерации и трансформации, но также на стадиях укоренения и адаптации укорененных растений к нестерильным условиям, может быть рекомендован для дальнейших фундаментальных исследований вигны при помощи методов обратной генетики. Поиск генотипов для использования в работах по генетическому редактированию, разработка новых, а также модификация существующих протоколов представляются крайне актуальными задачами для получения растений с заданными свойствами. Усовершенствование и разработка технологий геномного редактирования необходимы для получения растений вигны, отвечающих требованиям, предъявляемым к культуре современным агропромышленным комплексом.

References/Литература

- Behura R., Kumar S., Saha B., Panda M.K., Dey M., Sadhukhan A., Mishra S., Alam S., Sahoo D.P., Sugla T., Sahoo L. Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1223. K. Wang (ed.) *Agrobacterium Protocols*. Vol. 1, Ch. 20. New York, NY: Springer Humana Press; 2014. p.255-264. DOI: 10.1007/978-1-4939-1695-5_20
- Bett B., Gollasch S., Moore A., Harding R., Higgins T.J.V. An improved transformation system for cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) via sonication and a kanamycin-geneticin selection regime. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:219. DOI: 10.3389/fpls.2019.00219
- Burlyayeva M.O., Gurkina M.V., Chebukin P.A. Screening of long-podded cowpea (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis* (L.) Verdc.) samples from VIR collection for resistance to biotic and abiotic stressors (Skrining obraztsov spazhevoy vigny (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis* (L.) Verdc.) iz kollektsii VIR na ustoychivost' k abioticheskim i bioticheskim stressoram). *Breeding and seed production of vegetable crops = Seleksiya i semenovodstvo ovoshchnykh kul'tur*. 2014;45:131-141. [In Russian] [Бурляева М.О., Гуркина М.В., Чебукин П.А. Скрининг образцов спаржевой вигны (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis* (L.) Verdc.) из коллекции ВИР на устойчивость к абиотическим и биотическим стрессорам. *Селекция и семеноводство овощных культур*. 2014;45:131-141).
- Che P., Chang S., Simon M.K., Zhang Z., Shaharyar A., Ourada J., O'Neill D., Zhang Z., Torres-Mendoza M., Guo Y., Marasigan K.M., Vielle-Calzada J.-P., Ozias-Akins P., Albertsen M.C., Jones T.J. Developing a rapid and highly efficient cowpea regeneration, transformation and genome editing system using embryonic axis explants. *The Plant Journal*. 2021;106(3):817-830. DOI: 10.1111/tpj.15202
- Efremova O.S., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N. Regeneration potential *in vitro* of soybean varieties in agrobacterial transformation. *Agrarian bulletin of Primorye*. 2017;4(8):21-23. [in Russian] (Ефремова О.С., Шкрыль Ю.Н., Веремейчик Г.Н. Регенерационный потенциал *in vitro* сортов сои (*Glycine max* (L.) Merr.) при агробактериальной трансформации. *Аграрный вестник Приморья*. 2017;4(8):21-23).
- Gerasimova S.V., Kolosovskaya E.V., Vkhorev A.V., Korotkova A.M., Hertig C.W., Genaev M.A., Domrachev D.V., Morozov S.V., Chernyak E.I., Shmakov N.A., Vasiliev G.V., Kochetov A.V., Kumlehn J., Khlestkina E.K. WAX INDUCER 1 Regulates β -Diketone biosynthesis by mediating expression of the *Cer-cqu* gene cluster in barley. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24:6762. DOI: 10.3390/ijms24076762
- Ignacimuthu S. Agrobacterium mediated transformation of *Vigna sesquipedalis* Koern (asparagus bean). *Indian journal of experimental biology*. 2000;38(5):493-498.
- Integrated DNA Technologies. PrimerQuest™ Tool. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/primerquest> [accessed Febr. 01, 2024].
- Ji J., Zhang C., Sun Z., Wang L., Duanmu D., Fan Q. Genome editing in cowpea *Vigna unguiculata* using CRISPR-Cas9. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(10):2471. DOI: 10.3390/ijms20102471
- Juranić M., Nagahatenna D.S.K., Salinas-Gamboa R., Hand M.L., Sánchez León N., Leong W.H., How T., Bazanova N., Spriggs A., Vielle-Calzada J.-P., Koltunow A.M.G. A Detached leaf assay for testing transient gene expression and gene editing in cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *Plant Methods*. 2020;16:88. DOI: 10.1186/s13007-020-00630-4
- Jyothishwaran G., Kotresha D., Selvaraj T., Srideshikan S.H., Rajvanshi P.K., Jayabaskaran C. A modified freeze-thaw method for efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Science*. 2007;93(6):770-772.
- Krylova E.A., Burlyayeva M.O., Tvorogova V.E., Khlestkina E.K. Contrast relative humidity response of diverse cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) genotypes: deep study using RNAseq approach. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25:11056. DOI: 10.3390/ijms252011056
- Mao J.Q., Zaidi M.A., Arnason J.T., Altosaar I. In vitro regeneration of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Blackeye cowpea via shoot organogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 2006;87:121-125. DOI: 10.1007/s11240-006-9145-8
- Murashige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15:473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Muthukumar B., Mariamma M., Veluthambi K., Gnanam A. Genetic transformation of cotyledon explants of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Report*. 1996;15:980-985. DOI: 10.1007/BF00231600
- Pal J.K., Kumar S., Singh M. Genetic transformation of *Vigna unguiculata* tissue by *Agrobacterium tumefaciens*. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2011;71(1):84-86.
- Popelka J.C., Gollasch S., Moore A., Molvig L., Higgins T.J. Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. *Plant Cell Reports*. 2006;25(4):304-312. DOI: 10.1007/s00299-005-0053-x
- Pratap A., Prajapati U., Singh C.M., Gupta S., Rathore M., Malviya N., Tomar R., Gupta A.J., Tripathi S., Singh N.P. Potential, constraints and applications of *in vitro* methods in improving grain legumes. *Plant Breeding*. 2018;137:235-249. DOI: 10.1111/pbr.12590
- Razgonova M.P., Burlyayeva M.O., Zinchenko Y.N., Krylova E.A., Chunikhina O.A., Ivanova N.M., Zakharenko A.M., Golokhvast K.S. Identification and spatial distribution of bioactive compounds in seeds *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

- by laser microscopy and tandem mass spectrometry. *Plants*. 2022;11:2147. DOI: 10.3390/plants11162147
- Sahoo L., Sugla T., Jaiwal P.K. *In vitro* regeneration and genetic transformation of cowpea, mungbean, urdbean and azuki bean In: P.K. Jaiwal; R.P. Singh (eds). *Applied Genetics of Leguminosae Biotechnology*. Dordrecht; Boston: Kluwer Academic Publishers; 2003. p.89-120.
- Somers D.A., Samac D.A., Olhoft P.M. Recent advances in legume transformation. *Plant Physiology*. 2003;131:892-899. DOI: 10.1104/pp.102.017681
- Ukhatova Y.V., Erastenkova M.V., Korshikova E.S., Krylova E.A., Mikhailova A.S., Semilet T.V., Tikhonova N.G., Shvachko N.A., Khlestkina E.K. Improvement of crops using the CRISPR/Cas System: new target genes. *Molecular Biology*. 2023;57(3):375-397. DOI: 10.1134/S0026893323030135
- Xing H.-L., Dong L., Wang Z.-P., Zhang H.-Y., Han C.-Y., Liu B., Wang X.-C., Chen Q.-J. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*. 2014;14:327. DOI: 10.1186/s12870-014-0327-y

Информация об авторах

Екатерина Александровна Крылова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, e.krylova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4917-6862>

Ольга Сергеевна Ефремова, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий специалист, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, 354340 Россия, Краснодарский край, Федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., 1, efremo.olga2010@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9212-2117>

Полина Сергеевна Вилис, лаборант-исследователь, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, p.vilis@vir.nw.ru

Елена Константиновна Хлесткина, доктор биологических наук, профессор РАН, директор, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, director@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

Юлия Васильевна Ухатова, кандидат биологических наук, заместитель директора, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, 354340 Россия, Краснодарский край, Федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., 1, y.ukhatova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9366-0216>

Information about the authors

Ekaterina A. Krylova, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, e.krylova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4917-6862>

Olga S. Efremova, Cand. Sci. (Agriculture), Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, Sirius University of Science and Technology, Scientific Center for Genetics and Life Sciences, 1, Olympic Avenue, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, 354340 Russia, efremo.olga2010@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9212-2117>

Polina S. Vilis, Laboratory Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, p.vilis@vir.nw.ru

Elena K. Khlestkina, Dr. Sci. (Biology), Professor of the Russian Academy of Sciences (RAS), Director, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, director@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

Yulia V. Ukhatova, Cand. Sci. (Biology), Deputy Director, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, Sirius University of Science and Technology, Scientific Center for Genetics and Life Sciences, 1, Olympic Avenue, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, 354340 Russia, y.ukhatova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9366-0216>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 16.05.2025; одобрена после рецензирования 07.06.2025; принята к публикации 21.06.2025.

The article was submitted on 16.05.2025; approved after reviewing on 07.06.2025; accepted for publication on 21.06.2025.